

На правах рукописи

**МЕДВЕДЕВА Елена Сергеевна**

**АДАПТАЦИЯ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* PG8 К УСЛОВИЯМ  
СРЕДЫ: МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ,  
ПАТОГЕННЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

03.02.03 – микробиология

03.01.04 – биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань-2010

Работа выполнена в лаборатории молекулярных основ патогенеза Учреждения Российской академии наук Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук  
Давыдова Марина Николаевна

**Научный консультант:** доктор биологических наук, профессор  
Чернова Ольга Александровна

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
Багаева Татьяна Вадимовна  
(ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский)  
федеральный университет», г. Казань)

доктор биологических наук, профессор  
Мелентьев Александр Иванович  
(Учреждение Российской академии наук  
Институт биологии УНЦ РАН, г. Уфа)

**Ведущая организация:** Учреждение Российской академии наук  
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,  
г. Москва

Защита состоится «28» октября 2010 года в «13» часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Автореферат разослан «\_\_\_» сентября 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор



Абрамова З.И.

**Актуальность проблемы.** *Acholeplasma laidlawii* (класс Mollicutes) – «вездесущая» (ubiquitous) микоплазма. Эта бактерия, обнаруживаемая в почвах, сточных водах, а также тканях высших эукариот, является основным контаминантом клеточных культур и возбудителем фитомикоплазмозов [Билай и др., 1988; Чернов и др., 2007; David *et al.*, 2010]. Контроль микоплазменных инфекций представляет проблему, решение которой связывают с исследованиями молекулярно-генетических основ адаптации микоплазм к условиям среды, определяющей широкую распространенность бактерий в природе и проявление патогенности [Чернов и др., 2007, 2009; Madsen *et al.*, 2006a, 2006b]. Однако о результатах соответствующих исследований имеются лишь единичные сообщения [Чернов и др., 2007, 2008, 2009; Weiner *et al.*, 2003; Cecchini *et al.*, 2007].

Сравнительно недавно были представлены данные об особенностях изменений морфофизиологии клеток *A. laidlawii* PG8, а также фитопатогенности микоплазмы в неблагоприятных условиях среды (НУС) [Мухаметшина, 2006; Chernov *et al.*, 2007; Windsor *et al.*, 2009b; Folmsbee *et al.*, 2010]. Было установлено, что при длительном культивировании *A. laidlawii* PG8 на среде с ограничением субстрата в культуре микоплазмы происходит увеличение количества ультрамикроформ (УМФ), линейный размер которых приближается к таковому минимальной клетки, способной к самостоятельному воспроизведению, и показано, что адаптированные к НУС и неадаптированные клетки *A. laidlawii* PG8 проявляют различную степень патогенности в отношении специфичного индикатора фитомикоплазмозов – *Vinca minor* L. [Мухаметшина, 2006; Chernov *et al.*, 2007].

Между тем широкое распространение *A. laidlawii* предполагает успешное преодоление микоплазмой воздействия *разнообразных* неблагоприятных факторов среды – резких изменений температуры среды, окислительного стресса, истощения питательных веществ, источников энергии и некоторых других. В связи с этим актуальным представляется выяснение влияния различных стрессоров на биологию микоплазмы и проявление ее патогенности.

Протеомный анализ, а также зондовая наноскопия, обеспечивающая визуализацию живых клеток организмов, определяют уникальные возможности исследования молекулярной и клеточной биологии бактерий в различных условиях среды (РУС) [Ushiki *et al.*, 2000; Renzone *et al.*, 2005; Cash, Argo, 2009]. Протеомное профилирование бактериальных клеток, образующихся в стрессовых условиях, позволяет выявлять стресс-реактивные белки, участвующие в механизмах выживания микроорганизмов в НУС [Goulhen *et al.*, 2003b; Renzone *et al.*, 2005; Cash, Argo, 2009; Zhang *et al.*, 2009]. Поиск соответствующих белков бактерий представляет значительный интерес как для выявления молекулярных основ адаптации микроорганизмов к стрессовым условиям, так и определения мишеней для контроля патогенов [Goulhen *et al.*, 2003a, 2003b].

Расшифровка генома *A. laidlawii* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>] обеспечила возможность проведения

соответствующих исследований в отношении «вездесущей» микоплазмы. Однако данные об их реализации пока отсутствуют.

**Цель работы** – выяснение особенностей адаптации *A. laidlawii* PG8 к условиям среды, связанных с морфологией, ультраструктурой, экспрессией белков и патогенностью микоплазмы.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести сравнительный анализ образования ультрамикроформ у *A. laidlawii* PG8 при культивировании микоплазмы в различных условиях среды – оптимальных и при воздействии *разных* стрессоров.
2. Провести сравнительный протеомный анализ клеток *A. laidlawii* PG8, образующихся в различных условиях среды.
3. Провести сравнительный анализ токсигенности клеток *A. laidlawii* PG8, образующихся в различных условиях среды.
4. Провести сравнительный анализ морфологии, ультрацитоструктуры и экспрессии белков у растений *Or. sativa* L., инфицированных клетками *A. laidlawii* PG8, образующимися в различных условиях среды.

**Научная новизна.** Впервые показано, что при длительном воздействии *различных* стрессоров в культуре микоплазмы возрастает количество УМФ – сферических, окруженных мембраной наноструктур (диаметр  $<0,2$  мкм, объем  $<0,00419$  мкм<sup>3</sup>).

В результате применения протеомного подхода выявлены особенности изменения экспрессии растворимых белков в клетках *A. laidlawii* PG8 при культивировании микоплазмы в РУС и идентифицирован 121 белок, участвующий в адаптации микоплазмы к стрессовым условиям.

Впервые показано, что адаптация *A. laidlawii* PG8 к стрессовым условиям сопровождается изменением генотоксических свойств бактерии. Установлена фитопатогенность *A. laidlawii* PG8 в отношении *Or. sativa* L. и показано, что адаптация *A. laidlawii* PG8 к стрессовым условиям сопровождается изменением вирулентных свойств бактерии. Идентифицированы общие и специфичные стресс-реактивные белки растений, модуляция экспрессии которых индуцируется адаптированными к стрессовым условиям и неадаптированными клетками *A. laidlawii* PG8.

**Научно-практическая значимость.** Полученные данные вносят вклад в понимание процессов адаптации *A. laidlawii* PG8 к условиям среды. Результаты работы могут служить основой для развития новых подходов к определению молекулярных механизмов формирования и эволюции системы «паразит-хозяин», а также способов контроля микоплазменных инфекций.

Выявленные стресс-реактивные белки *A. laidlawii* PG8 и *Or. sativa* L. могут быть потенциальными мишенями для определения механизмов формирования системы «паразит-хозяин» и способов её контроля.

Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в медицинских, ветеринарных, сельскохозяйственных, биологических и биотехнологических учреждениях,

занимающихся разработкой способов диагностики и подавления микоплазменных инфекций, а также в учебном процессе, в том числе курсах лекций по биохимии, молекулярной биологии, микробиологии, стрессологии и физиологии растений в ВУЗах.

**Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование.** Работа в 2006-2010 гг. проводилась в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Взаимодействие микоплазм и эукариот: молекулярно-генетические основы образования некультивируемых форм бактерий и формирования системы «паразит-хозяин» (№ гос. рег. 01200901965).

Исследования автора как исполнителя данной темы поддержаны грантами ГК № 02.512.11.2010 в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России» на 2007-2012 годы по теме «Протеомно-транскриптомный анализ клеток микоплазм и эукариот при их взаимодействии для создания методов контроля системы «паразит-хозяин», ГК № 02.740.11.0391 в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» по теме «Секретируемые факторы токсигенности бактерий как перспективные средства контроля патологических процессов», РФФИ 05-04-49435а «Молекулярные основы адаптации микоплазм (*Acholeplasma laidlawii*) к биогенным и абиогенным стрессорам» 2006-2008 гг., а также грантом ведущей научной школы (руководитель акад. И.А. Тарчевский) № НШ-5399.2008.4 и Грантом Президента молодым кандидатам № МК-3372.2009.4 (руководитель к.б.н. М.В. Трушин).

Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора. Синтез праймеров, двумерный электрофорез и идентификацию полипептидов проводили в ФГУ «НИИ физико-химической медицины» ФМБА России; оценку генотоксичности клеток *A. laidlawii* PG8 и наноскопию клеток *A. laidlawii* PG8 – в ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (биолого-почвенный факультет, кафедра микробиологии и физический факультет, кафедра оптики и нанофотоники соответственно). Выражаю искреннюю благодарность сотрудникам ФГУ «НИИ физико-химической медицины» ФМБА России – д.б.н., проф. В.М. Говоруну, к.х.н. Т.А. Акопиан, к.х.н. М.В. Серебряковой, М.А. Роговой, В.А. Карпову, а также сотрудникам КФУ – д.б.н., проф. О.Н. Ильинской, к.ф.-м.н. О.А. Коноваловой, к.б.н. А.Б. Маргулис за возможность проведения совместных работ и помощь в экспериментах.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Условия культивирования *A. laidlawii* PG8 влияют на образование ультрамикрочастиц микоплазмы – сферических, окруженных мембраной наноструктур (объем 0,00052358-0,004 мкм<sup>3</sup>).
2. Различные виды стрессоров индуцируют у *A. laidlawii* PG8 модуляцию экспрессии как специфических, так и общих белков.

3. Адаптация *A. laidlawii* PG8 к стрессовым условиям сопровождается изменением генотоксических свойств микоплазмы.

4. *A. laidlawii* PG8 проявляет фитопатогенность в отношении *Or. sativa* L. (рис посевной). Адаптация микоплазмы к НУС сопровождается изменением вирулентных свойств бактерии.

5. Ответные реакции растений *Or. sativa* L., связанные с модуляцией экспрессии белков, на инфицирование клетками *A. laidlawii* PG8, образующимися в РУС, различаются.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы доложены на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы в биотехнологии» (Казань, 2008), I городской студенческой конференции «Междисциплинарные исследования в области естественных наук» (Казань, 2008), IV межрегиональной конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2008), 12-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2008), I Всероссийском, с международным участием, биологическом конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия 2008» и Школе-конференции «Биология: традиции и инновации в 21 веке» (Казань, 2008), Итоговой конференции Учреждения Российской академии наук Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН (Казань, 2008), II Всероссийском, с международным участием, конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия» (Пермь, 2009), XIV Международной конференции «Ферменты микроорганизмов в биотехнологии и медицине» (Казань, 2009), IV Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009), XIII Европейском симпозиуме студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-2009» (Казань, 2009), 13-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2009), Итоговой конференции Учреждения Российской академии наук Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН (Казань, 2010), 18-м Международном конгрессе Международного общества микоплазмалогов (Кьянчано Терме, Италия, 2010), Российской конференции «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» (Казань, 2010).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 181 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы, а также приложения. В работе представлено 9 таблиц и 35 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 258 источников, из них 56 – в отечественных изданиях.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Материалы и методы исследований

В работе был использован штамм *Acholeplasma laidlawii* PG8, полученный из коллекции микроорганизмов Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (РАМН, Москва). Культуру клеток *A. laidlawii* PG8 выращивали при 37° С в жидкой питательной среде Эдварда, с модификациями [Борхсениус и др., 2002]. Клетки микоплазмы исследовались при оптимальных, а также стрессовых условиях, индуцируемых характерными для среды обитания микоплазмы неблагоприятными факторами (кратковременное воздействие низкой температуры, обуславливающее холодовой шок (ХШ), длительное воздействие низкой температуры (ДНТ), воздействие активных форм кислорода, индуцирующих окислительный стресс (ОС), изменение субстрата (ИС) и совокупное действие стрессоров (СДС) – понижение температуры среды и ограничение субстрата).

**Инкубацию** клеток *A. laidlawii* PG8 (поздняя log-фаза) с перекисью водорода (ОС) проводили в присутствии 1мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Hallamaa *et al.*, 2008]. ХШ и ДНТ для клеток *A. laidlawii* PG8 проводили в условиях кратковременного и длительного снижения температуры до +8°С соответственно [Panoff *et al.*, 1997]. Культивирование *A. laidlawii* PG8 в условиях ИС проводили при 37°С в жидкой питательной среде Эдварда при добавлении трегалозы вместо глюкозы – основного источника энергии микоплазмы [Борхсениус и др., 2002]. Культивирование клеток в условиях СДС проводили в соответствии с алгоритмом, разработанным ранее сотрудниками лаборатории молекулярных основ патогенеза КИББ КазНЦ РАН [Чернов и др., 2005]. Клетки культуры *A. laidlawii* PG8, выращенной в оптимальных условиях – на полноценной питательной среде Эдварда (ППСЭ) при 37°С [Скрипаль, 1983], составили контрольные образцы, а клетки микоплазмы, полученные в стрессовых условиях, – опытные. В случаях ОС, ХШ, ДНТ, ИС для анализа использовались клетки микоплазмы поздней экспоненциальной фазы, а СДС – 8 недель культивирования.

**Численность колониеобразующих единиц** (КОЕ) определяли высевом бактериальной суспензии соответствующих разведений на агаризованные среды [Пименова и др., 1983].

**Трансмиссивную электронную микроскопию** (ТЭМ) клеток микоплазмы проводили согласно Cole [1983]. Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-III (Швеция). Образцы просматривали на электронном микроскопе JEM-1200EX (Япония).

**Оценку токсичных и генотоксичных свойств** *A. laidlawii* PG8 проводили по Quillardet *et al.* [1982].

**Выделение ДНК** из клеток микоплазм осуществляли с помощью метода фенольной экстракции [Маниатис и др., 1984]. Дополнительно препараты ДНК обрабатывали РНКазой («Serva», ФРГ) и протеиназой К («Хеликон», Россия).

**Атомно-силовую микроскопию (АСМ)** клеток *A. laidlawii* PG8 проводили по Braga, Ricci [2004]. Исследования проводили на атомно-силовом микроскопе Solver P47H («НТ-МДТ», Россия). Для обработки данных использовали программу Nova 1.0.26 RC1 (разработчик – НТ-МДТ, Россия).

**Анализ аминокислотных последовательностей** и поиск доменов проводили в BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), SwissProt (<http://cn.expasy.org/>), BLOCKs (<http://blocks.fhcrc.org/>), Prosite (<http://cn.expasy.org/prosite/>), Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

**Инфицирование растений *Oryza sativa* L.** (рис посевной, сорт «Луговой») клетками *A. laidlawii* PG8 проводили по Чернову и др. [2009]. Растения выращивали в стерильных условиях. 10-ти дневные проростки растений заражали через корневую систему посредством инкубирования корешков растений в модифицированном растворе Кноппа, не содержащем и содержащем клетки *A. laidlawii* PG8, в случаях контроля и опыта соответственно.

**Выделение, дифференциальное окрашивание флуоресцентными красителями (CyDye3, CyDye5), разделение с помощью двумерного электрофореза, а также идентификацию методом масс-спектрометрии белков** проводили по Viswanathan *et al.* [2006], Деминой и др. [2009]. Полученные данные анализировали с помощью программы Phoretix 2D Advanced v6.01 (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne, Великобритания). Идентификацию белков по «пептидному фингерпринту» осуществляли при помощи программы Mascot Peptide Fingerprint (Matrix Science, Великобритания). Поиск проводился в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>).

Белки, выделенные из клеток *A. laidlawii* PG8, культивируемых в оптимальных условиях среды, составляли контроль, а из клеток микоплазмы, образующихся в стрессовых условиях, – опыт.

Белки, выделенные из листьев растений, выращенных на среде, не содержащей клетки *A. laidlawii* PG8, составляли контроль, а на среде, содержащей клетки *A. laidlawii* PG8, – опыт.

**Статистический анализ данных** проводили с применением стандартных математических методов расчета среднеквадратичного отклонения и сравнения средних по критерию Стьюдента в программе MS Excel (Microsoft). При сравнении количества клеток в классах использовали критерий  $\chi^2$  ( $p$ ) с поправкой Йейтса на непрерывность. Критерий вероятности  $p < 0,05$  принимали достаточным для достоверной разницы опытной и контрольной групп данных [Лакин, 1990]. При множественных сравнениях применяли поправку Бонферрони, согласно которой пороговый уровень значимости рассчитывался по формуле  $0,05/n$ , где  $n$  – число выполненных статистических тестов [Гланц, 1999]. Статистически значимыми считали результаты меньше порогового уровня значимости, определенного с учетом поправки Бонферрони ( $p < 0,01$ ).

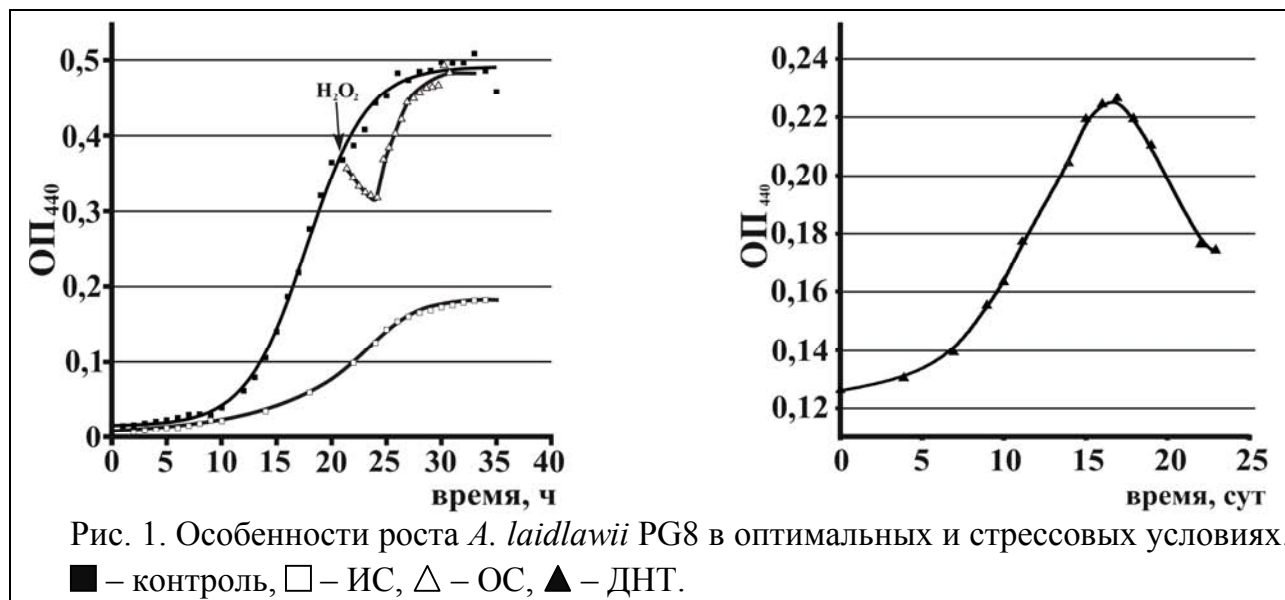


## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 2.1. Сравнительный анализ образования ультрамикрочорм *A. laidlawii* PG8 при культивировании микоплазмы в различных условиях среды

Для решения задач работы клетки *A. laidlawii* PG8 необходимо было отбирать на определенных стадиях роста бактерии [см. гл. 1]. В связи с этим предварительно нами были определены особенности роста микоплазмы в РУС.

Основные параметры роста *A. laidlawii* PG8 в оптимальных и стрессовых условиях существенно различались (рис. 1). Так, скорость роста контрольной культуры составляла  $0,192 \text{ ч}^{-1}$ , а в условиях ИС, ОС и ДНТ она снижалась до  $0,128 \text{ ч}^{-1}$ ;  $0,096 \text{ ч}^{-1}$  и  $0,003 \text{ ч}^{-1}$  соответственно. Однако изменение численности КОЕ микоплазмы наблюдалось только при длительном культивировании бактерии в условиях СДС (КОЕ  $3 \times 10^4$  по сравнению с  $12,1 \times 10^8$  в контроле).



Для выяснения влияния условий среды *A. laidlawii* PG8 на образование УМФ в культуре микоплазмы нами были использованы методы ТЭМ и АСМ. Полученные нами результаты свидетельствуют, что в культуре *A. laidlawii* PG8 наряду с типичными клетками микоплазмы присутствуют УМФ (рис. 2) – сферические, окруженные мембраной наноструктуры, линейный размер которых меньше, чем у минимальной клетки, способной к самостоятельному воспроизведению (диаметр 0,2 мкм) [Kajander, Ciftcioğlu, 1998; Rawal, Pretorius, 2005]. Соотношение типичных клеток и УМФ в культурах *A. laidlawii* PG8, выращенных в оптимальных и стрессовых условиях, различаются (рис. 3).

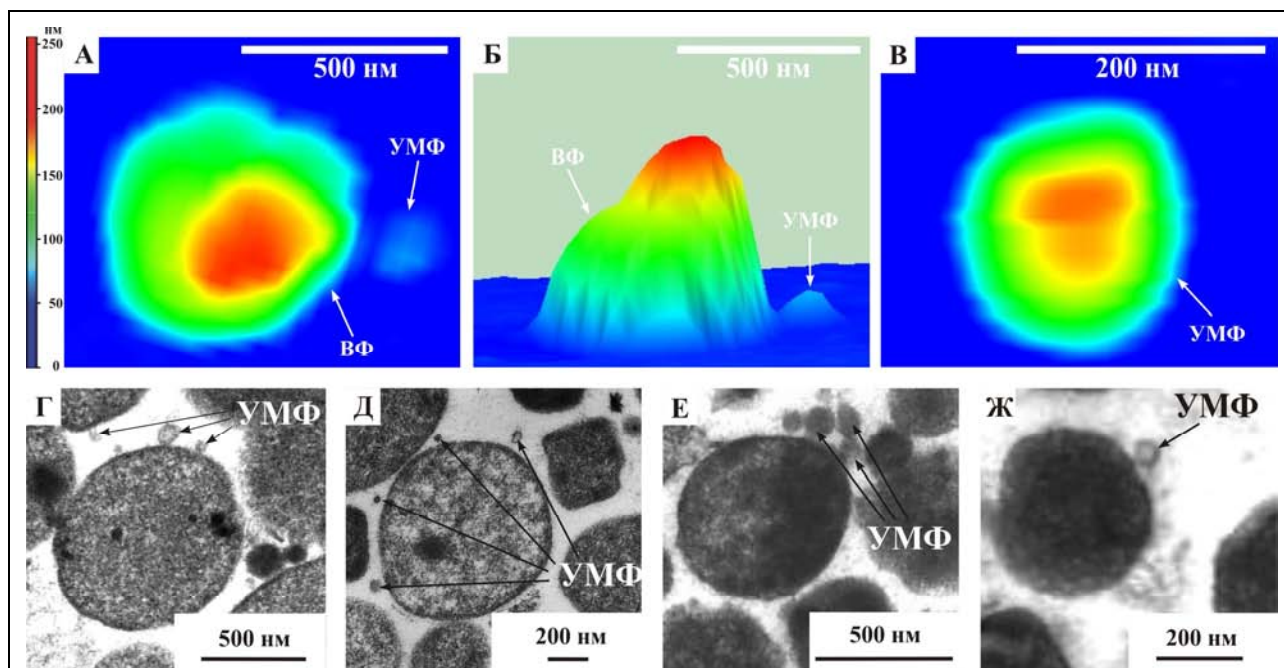


Рис. 2. Клетки и УМФ *A. laidlawii* PG8. А, Б, В – АСМ (2D – А, Б; 3D – В); Г, Д, Е, Ж – ТЭМ.

ВФ – «типичные» клетки микоплазмы (вегетативные формы), УМФ – ультрамикроформы.

В случаях ДНТ, СДС наблюдалось достоверное увеличение (по сравнению с контролем) количества УМФ. Согласно данным АСМ, длительное культивирование *A. laidlawii* PG8 при воздействии *разных* стрессоров приводит к статистически значимому увеличению в культуре микоплазмы УМФ, объемы которых ( $0,00052358-0,004$  мкм<sup>3</sup>) меньше, чем у типичных клеток микоплазмы, а также минимальной клетки, способной к самостоятельному воспроизведению (объем  $\geq 0,00419$  мкм<sup>3</sup>, согласно теоретическим расчетам). В случаях ХШ и ОС в культурах микоплазмы тоже наблюдалось возрастание УМФ, а в случае ИС – напротив, снижение, но разница не достигала статистической значимости.

В состав УМФ *A. laidlawii* PG8 могут входить наноклетки бактерии [Мухаметшина, 2006; Chernov *et al.*, 2006]. Однако по размерам, морфологии, ультраструктуре и особенностям образования подавляющее большинство УМФ соответствует мембранным везикулам [Choi *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009]. У бактерий мембранные везикулы участвуют в секреции белков, межклеточной коммуникации и патогенезе [Lee *et al.*, 2009; Ellis, Kuehn, 2010]. Биогенез и функции мембранных везикул у микоплазм не исследованы.

В результате анализа трансмиссивных микрографий нами было обнаружено, что условия среды влияют на количество в популяции бактерии клеток с повышенной электронной плотностью (рис. 4).

Так, в случае ХШ, ДНТ и СДС было зарегистрировано достоверное увеличение (по сравнению с контролем) в популяции микоплазмы количества клеток с повышенной электронной плотностью. В случае ОС количество таких

клеток тоже возрастало, а в случае ИС, напротив, уменьшалось, но разница не достигала статистической значимости.

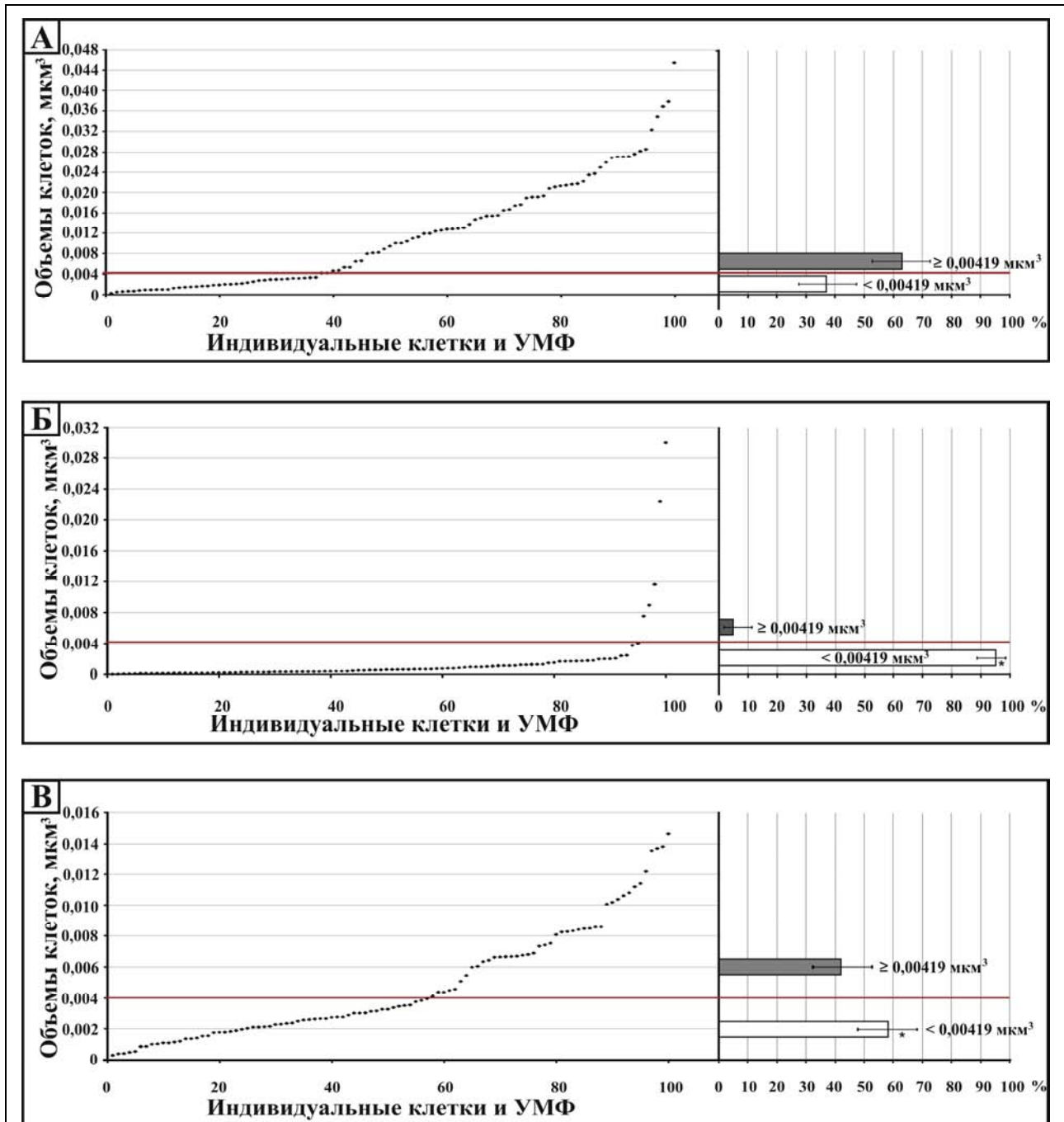


Рис. 3. Соотношение типичных клеток и УМФ в культуре *A. laidlawii* PG8 при культивировании микоплазмы в оптимальных (А) и стрессовых – СДС (Б) и ДНТ (В) – условиях. График построен на основе объемов индивидуальных клеток и УМФ (от минимальных к максимальным). Каждая точка соответствует объему индивидуальной клетки или УМФ. Обследовалось по 100 объектов в разных полях зрения. Диаграммы справа отражают изменения соотношений клеток и УМФ в контрольной и опытной культурах микоплазмы. \* –  $p < 0,025$ .

Электронная плотность клеток бактерий связана с количеством рибосом в клетке [Билай и др., 1988]. Возрастание количества рибосом у части клеток

микоплазмы в стрессовых условиях может быть обусловлено интенсификацией синтеза белков рибосом и/или стресс-реактивных белков в *субпопуляции* бактерии.

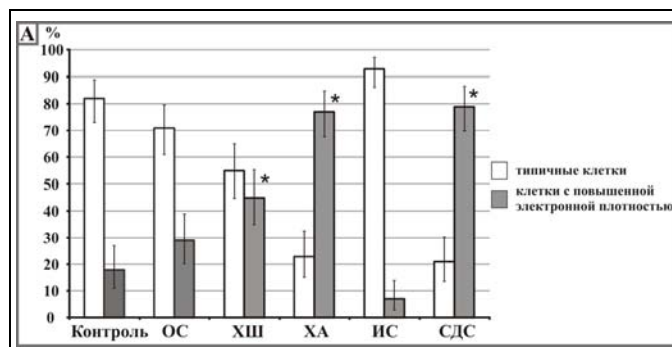


Рис. 4. Изменение доли клеток с повышенной электронной плотностью в популяции *A. laidlawii* PG8 при культивировании микоплазмы в РУС (по данным ТЭМ).

\* –  $p < 0,01$ .

Выявленные различия образования УМФ, соотношения клеточных морфотипов в популяции *A. laidlawii* PG8 и параметров роста микоплазмы в РУС могут отражать особенности экспрессии генома и белкового трафика у бактерии в соответствующих условиях среды.

## 2.2. Сравнительный протеомный анализ клеток *A. laidlawii* PG8, образующихся в различных условиях среды

В результате двумерного разделения дифференциально окрашенных флуоресцентными красителями белков клеток *A. laidlawii* PG8, образующихся в оптимальных и стрессовых условиях, нами были выявлены количественные и качественные различия в пуле растворимых белков у микоплазмы в РУС.

В стрессовых условиях у микоплазмы регистрировались количественные и качественные изменения в составе изоформ, связанные со смещением в кислую область относительно белка контрольных клеток, и наблюдалась модуляция уровня экспрессии белков.

В случае ОС было обнаружено 26 стресс-реактивных белков, которые, согласно функциональным категориям COG, участвуют в транскрипции (2), трансляции (5), углеводном обмене и энергообразовании (7), а также вирулентности (9).

В случае ХШ было выявлено тоже 26 стресс-реактивных белков, которые, согласно функциональным категориям COG, участвуют в репликации (1), транскрипции (2), трансляции (5), углеводном обмене и энергообразовании (8), а также вирулентности (10).

Качественный состав стресс-реактивных белков в случае ХШ и ОС в значительной мере совпадал (за исключением LigA, PdhD,  $\beta$ -lac дифференциально экспрессированных в случае ХШ, но не ОС и GlyA, ATPase, ACL\_0995 модуляция экспрессии которых наблюдалась в случае ОС, но не ХШ). Сходные изменения экспрессии белков в клетках *A. laidlawii* PG8 при ХШ

и ОС могут быть вызваны индукцией ОС в клетках бактерии при ХШ [Смирнова и др., 2001; Gomaа, Momtaz, 2007].

В целом результаты анализа изменений экспрессии белков *A. laidlawii* PG8 с точки зрения их функциональных категорий свидетельствуют, что при ХШ и ОС усиливается экспрессия белков, определяющих транскрипцию (RpoB, Mar) и трансляцию (RpsA, RplL), но снижается уровень экспрессии белков, участвующих в энергообразовании, транспорте и метаболизме углеводов (GAPDH, Pkg, Pgm), а также *вирулентности* (TufB, Hsp20, SodA, GAPDH, Pkg, PdhD).

В случае ДНТ было идентифицировано 59 дифференциально экспрессированных белков, которые, согласно функциональным категориям COG, участвуют в репликации (1), транскрипции (2), трансляции (10), энергообразовании и метаболизме углеводов (18), нуклеотидов (2) и аминокислот (2), а также вирулентности (21).

Результаты анализа изменений экспрессии белков *A. laidlawii* PG8 свидетельствуют, что в условиях ДНТ усиливается экспрессия белков, определяющих транскрипцию (Tex, LacI), энергообразование, транспорт и метаболизм углеводов (Kba, Pkg, Pgm, Pgm, PdhA, PdhB, PdhD, ACL\_0661), но снижается уровень экспрессии белков, участвующих в трансляции (RpsA, GlnRS, ProRS, GlyRS, PheRS, AspRS, HisRS), метаболизме аминокислот (PepF, ACL\_0998)) и нуклеотидов (Prs, DeoA), а также *вирулентности* (SodA, Kba, GAPDH, Pkg).

Особенности модуляции экспрессии белков *A. laidlawii* PG8 в случаях ДНТ и ХШ частично совпадали, что согласуется с данными исследований экспрессии белков у других бактерий в соответствующих условиях, свидетельствующими о различных механизмах, определяющих реактивность микроорганизмов на кратковременное и длительное снижения температуры среды [Shivaji, Prakash, 2010].

В случае ИС был идентифицирован 61 дифференциально экспрессированный белок. Выявленные стресс-реактивные белки, согласно функциональным категориям COG, участвуют в репликации (4), транскрипции (5), трансляции (12), энергообразовании и метаболизме углеводов (16), нуклеотидов (5) и аминокислот (1), а также вирулентности (17).

Результаты анализа изменений экспрессии белков *A. laidlawii* PG8 свидетельствуют, что при ИС усиливается экспрессия белков, определяющих энергообразование, транспорт и метаболизм углеводов (Kba, GAPDH, PdhA, PdhB (2 изоформы), PdhD (2 изоформы), ACL\_0205 (2 изоформы), ACL\_0661), нуклеотидов (Rnr, Cmpk, DeoA), а также участвующих в защитных механизмах (GroEL, Hsp20 (2 изоформы), ClpB (3 изоформы), Lon, SodA, AAD (3 изоформы), GlyA) и вирулентности (GroEL, Hsp20 (2 изоформы), ClpB (3 изоформы), Lon, SodA, Kba, GAPDH, PdhB (2 изоформы), PdhD (2 изоформы)), но снижается уровень экспрессии белков, участвующих в репликации (ParE,

GyrB, LigA, UvrA), транскрипции (RpoB, Tex, GreA) и трансляции (EF-G, RpsA, RpsF, RplL, GlnRS, ProRS, GlyRS, SerRS, PheRS, AspRS, HisRS).

Основные тенденции изменения экспрессии белков клеток *A. laidlawii* PG8, культивируемых на среде с трегалозой, в значительной мере совпадали с таковыми при длительном культивировании микоплазмы в стрессовых условиях (ДНТ и СДС). Это может быть связано с участием трегалозы в защитных реакциях бактерий при воздействии стрессоров [Elbein *et al.*, 2003; Phadtare, 2004].

В случае СДС было идентифицировано 106 дифференциально экспрессированных белков, которые, согласно функциональным категориям по COG, участвуют в репликации (6), транскрипции (6), трансляции (21), энергообразовании и метаболизме углеводов (32), нуклеотидов (4) и аминокислот (3), а также вирулентности (43).

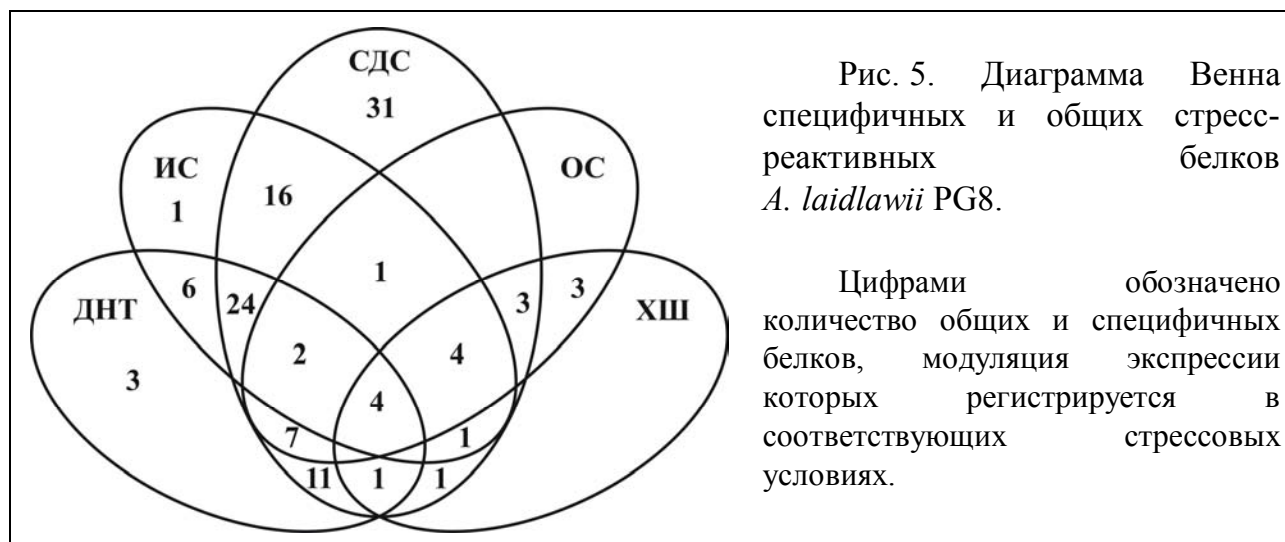
Модуляция экспрессии большинства стресс-реактивных белков *A. laidlawii* PG8 в случае СДС была связана со снижением уровня экспрессии. Для 31 белка, регистрируемого в контроле, экспрессия в опыте не проявлялась. Снижение уровня экспрессии 8 из этих белков (GlnRS, ProRS, PheRS, ACL\_0345, AckA, Hpr2, ACL\_0240, ACL\_0995) наблюдалось также при длительном культивировании микоплазмы в условиях ДНТ и ИС. Поскольку эти белки участвуют в фундаментальных клеточных процессах, особенности их синтеза, участия в ассоциатах и локализации в клетках микоплазмы представляют особый интерес.

Результаты анализа изменений экспрессии белков *A. laidlawii* PG8 свидетельствуют, что при СДС усиливается экспрессия белков, определяющих защитные механизмы (GroEL (2 изоформы), Hsp20 (2 изоформы), Trigger factor), энергообразование, транспорт и обмен углеводов (Kba (3 изоформы), TrpA (2 изоформы), GAPDH (3 изоформы), Pgi (3 изоформы), Pgm (2 изоформы), PdhB (2 изоформы), PdhC), но снижается уровень экспрессии белков, участвующих в репликации (GyrB, Nfo, Maf), трансляции (TufB (2 изоформы), EF-G (4 изоформы), Tsf, RpsA (2 изоформы), PNPase, RpsF, GlyRS, SerRS, HisRS), транспорте и метаболизме аминокислот (PepF, ArgE, AmpT), нуклеотидов (Prs, Cmpk, DeoA), а также *вирулентности* (TufB (2 изоформы), EF-G (4 изоформы), Tsf, RpsF, PNPase, GroEL, Hsp20, GroES, GrpE, SodA, Kba, GAPDH, Pgi, Pgm (2 изоформы), PdhA, PdhB, PdhD, PepF).

В результате сравнительного анализа дифференциально экспрессированных белков *A. laidlawii* PG8 в РУС нами были выявлены белки микоплазмы, сходный характер модуляции которых наблюдался при нескольких видах стрессов (рис. 5). Так, 23 белка *A. laidlawii* PG8 (RpoB, Mar, TufB, RpsA (2 изоформы), RplL, PDF, Hsp20, Lon (2 изоформы), SodA, AAD (3 изоформы), AmyA, GlyA, GAPDH, Pgi (3 изоформы), Pgm (3 изоформы), PdhD, ATPase, ACL\_0483, ACL\_0995,  $\beta$ -lac) оказались общими стресс-реактивными белками в случае кратковременного воздействия стрессоров (ОС, ХШ) и 16 (GyrB, RpsA, GlnRS, ProRS, GlyRS, PheRS, HisRS, ACL\_0345, Pgi, PdhB, AckA,



Hpr2, ACL\_0240, Prs, ACL\_0992, ACL\_0995) – в случае длительного культивирования клеток микоплазмы в условиях ИС, ДНТ, СДС, а 4 (RpsA, Lon, SodA, GAPDH) – общими стресс-реактивными белками, изменение которых регистрировалось при всех вышеуказанных условиях среды. Соответствующие белки и их гены могут быть мишенями при разработке способов контроля микоплазмы.

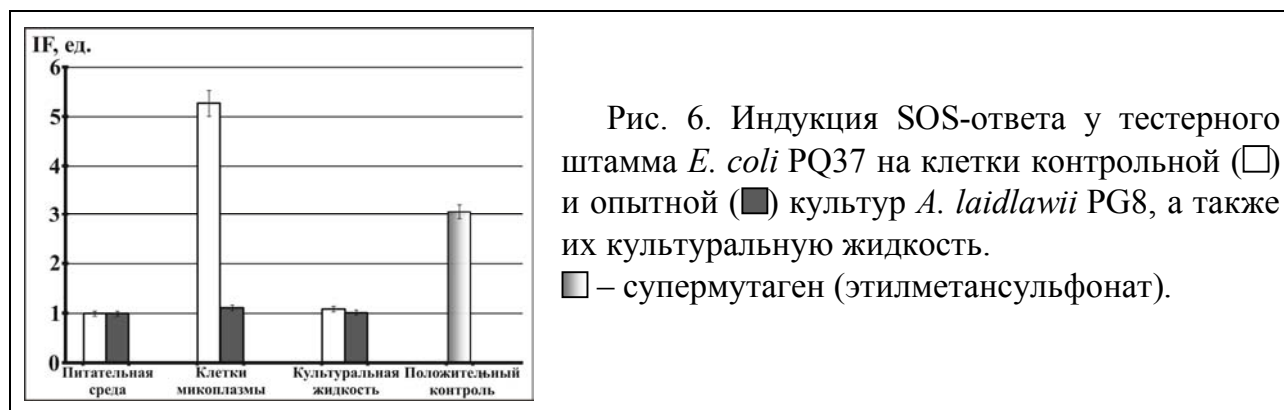


В целом результаты сравнительного анализа модуляции экспрессии белков у *A. laidlawii* PG8 при культивировании микоплазмы в РУС свидетельствуют, что при длительном пребывании микоплазмы в стрессовых условиях (ДНТ, СДС) происходит существенное увеличение уровня экспрессии PNPase (полирибонуклеотид-нуклеотидилтрансфераза) – глобального регулятора вирулентности фитопатогенных бактерий и адаптации их к РУС [Carpousis, 2002; Clements *et al.*, 2002] и снижение экспрессии белков, участвующих в вирулентности микоплазмы. Особенности дифференциальной экспрессии соответствующих белков могут обуславливать различия патогенности у неадаптированных и адаптированных к НУС клеток бактерий.

### 2.3. Сравнительный анализ токсигенности клеток *A. laidlawii* PG8, образующихся в различных условиях среды

В результате наших исследований было установлено, что *A. laidlawii* PG8 обладает генотоксическими свойствами. Так, клетки контрольной культуры *A. laidlawii* PG8 индуцировали SOS-ответ у клеток тестерного штамма *E. coli* PQ37 (рис. 6). Однако у клеток *A. laidlawii* PG8, образующихся в условиях СДС, генотоксические свойства не проявлялись. Полученные данные позволяют заключить, что адаптация *A. laidlawii* PG8 сопровождается изменением генотоксичных свойств бактерии – адаптированные к НУС (СДС) клетки *A. laidlawii* PG8, в отличие от неадаптированных, не оказывают ДНК-повреждающего действия в отношении тестерного штамма *E. coli* PQ37.

Культуральная жидкость адаптированных к НУС и неадаптированных клеток *A. laidlawii* PG8 ДНК-повреждающего действия в отношении тестерного штамма *E. coli* PQ37 не оказывали. Отсутствие SOS-ответа у клеток тестерного штамма *E. coli* PQ37 на культуральную жидкость *A. laidlawii* PG8 может быть связано с наличием в соответствующей среде очень низких концентраций генотоксических метаболитов и/или локализацией их в плазматической мембране бактерии.



Эффект аттенуации генотоксичности бактерий при адаптации их к НУС был описан ранее для *M. gallisepticum* S6 и *M. hominis* PG37 [Chernov *et al.*, 2009]. Это позволяет предполагать наличие у филогенетически дистанцированных представителей класса Mollicutes общих триггерных механизмов реализации в определенных условиях среды вирулентных свойств, связанных с токсигенностью.

#### 2.4. Сравнительный анализ морфологии, ультрацитоструктуры и экспрессии белков у растений *Or. sativa* L., инфицированных клетками *A. laidlawii* PG8, образующимися в различных условиях среды

У растений, выращенных на средах, содержащих адаптированные к НУС (СДС) или неадаптированные клетки *A. laidlawii* PG8, выраженные морфологические аномалии, характерные для фитомикоплазмозов (карликовость, развитие боковых побегов, задержка роста, пожелтение листьев), а также значимые различия в отношении показателей зеленой массы и длины растений в контрольной и опытной группах не были обнаружены. Однако у большинства растений наблюдалось снижение содержания в листьях хлорофилла; у единичных растений отмечались апикальный некроз, проявления хлороза и скручивание листьев.

Результаты ПЦР-анализа свидетельствовали о наличии ДНК *A. laidlawii* PG8 в тканях листьев у растений, выращенных на среде с неадаптированными клетками микоплазмы. В результате анализа трансмиссивных микрографий в проводящей системе листа и межклетниках губчатой паренхимы соответствующих растений обнаруживались единичные,



ограниченные мембраной клетки округлой формы (линейный размер – 500-700 нм) с характерной для микоплазм морфологией и ультраструктурной организацией. Растения риса имели при этом различно выраженные признаки хлороза и изменения ультраструктурной организации. Целостность тонопласта у растений была нарушена, центральная вакуоль клеток паренхимы содержала рыхлый осмиофильный компонент, тилакоиды в хлоропластах располагались рыхло, наблюдались редукция гранальной системы и увеличение числа пластоглобул.

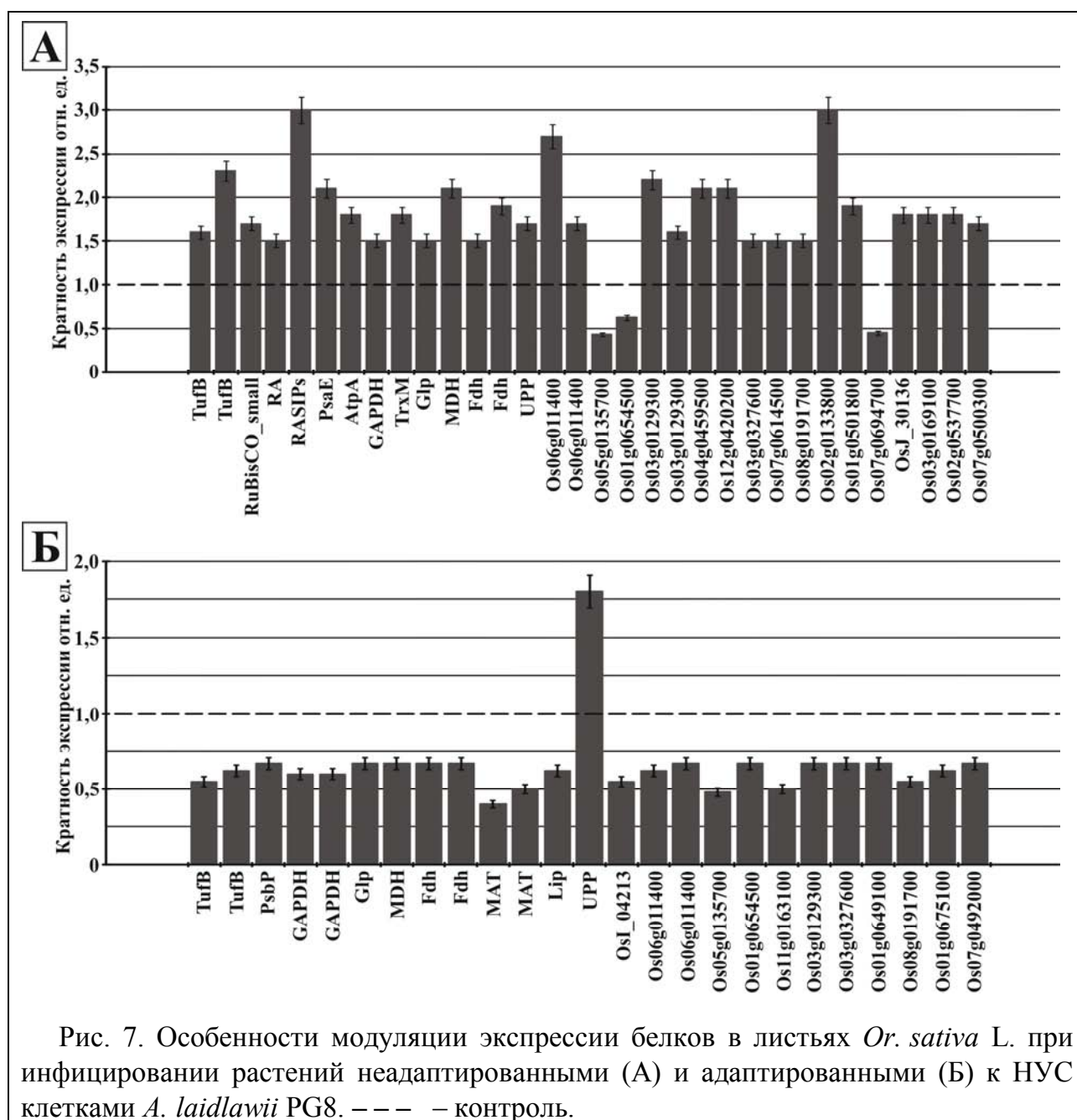
В ультратонких срезах тканей растений, выращенных на среде, содержащей адаптированные клетки *A. laidlawii* PG8, клетки микоплазмы не были выявлены. Данные ПЦР-анализа также свидетельствовали об отсутствии в исследованных образцах ДНК *A. laidlawii* PG8. Однако у растений обнаруживались значительные изменения ультраструктурной организации. Строма хлоропластов клеток растений была электронно-плотная; на её фоне отмечалась более прозрачная область внутритилакоидного пространства; гранальная система была слабо развита; хлоропласты в клетках располагались пристеночно и не содержали крахмальных зерен; вакуоли клеток обкладок сосудов и паренхимных клеток были заполнены рыхлым содержимым; митохондрии имели просветленный матрикс с немногочисленными кристами.

Полученные данные позволяют заключить, что клетки адаптированной к НУС (СДС) культуры микоплазмы не проникают, в отличие от клеток неадаптированной культуры, в ткани листьев через корневую систему, но индуцируют у растений изменения морфологии и ультраструктурной организации.

Ответные реакции растений *Or. sativa* L., связанные с модуляцией экспрессии белков, на инфицирование клетками *A. laidlawii* PG8, образующимися в РУС, различаются (рис. 7). Модуляция экспрессии 13 из 44 идентифицированных стресс-реактивных белков *Or. sativa* L. индуцируется как адаптированными к НУС (СДС), так и неадаптированными клетками *A. laidlawii* PG8, а 12 и 19 – адаптированными и неадаптированными клетками микоплазмы соответственно. При этом модуляция экспрессии белков *Or. sativa* L. в случае выращивания растений на среде с неадаптированными клетками *A. laidlawii* PG8 была связана главным образом с повышением уровня экспрессии, а на среде с адаптированными к НУС клетками *A. laidlawii* PG8, напротив, с понижением.

Модуляция экспрессии некоторых белков (TufB (2 изоформы), RA, AtpA, GAPDH (2 изоформы), Glp, MDH (2 изоформы), Os03g0129300 (2 изоформы), Os04g0459500, Os01g0649100, Os07g0694700, OsJ\_30136, Os02g0537700, Os01g0675100) и ее особенности, обнаруженные у растений при инфицировании *A. laidlawii* PG8, также регистрировались у *Or. sativa* L. при заражении другими бактериями [Mehta *et al.*, 2008]. Однако многие (27) белки *Or. sativa* L., проявляющие дифференциальную экспрессию при заражении растений *A. laidlawii* PG8, впервые выявлены в качестве реактивных в

отношении бактериальных патогенов. Это свидетельствует о дифференцированной реактивности *Or. sativa* L. в отношении разных бактерий, а также клеток микоплазмы, образующихся в РУС. В этой связи функции гипотетических белков UPP, OsI\_04213, Os06g0114000, Os05g0135700, Os01g0654500, Os11g0163100, Os03g0129300, Os04g0459500, Os12g0420200, Os03g0327600, Os01g0649100, Os07g0614500, Os08g0191700, Os02g0133800, Os01g0501800, Os07g0694700, OsJ\_30136, Os03g0169100, Os02g0537700, Os07g0500300, Os01g0675100, Os07g0492000 представляют значительный интерес с точки зрения специфичных стресс-реактивных белков *Or. sativa* L. в отношении *A. laidlawii* PG8.



В целом полученные нами данные свидетельствуют, что изменения уровня экспрессии большинства белков *Or. sativa* L. при инфицировании растений *A. laidlawii* PG8 незначительно превышают значимые ( $\geq 1,5$ ) показатели. Это согласуется с особенностями патогенности микоплазм, определяющими персистентные инаппарантные инфекции [Razin, 2010; Citti *et al.*, 2010].

Отсутствие выраженных признаков заболеваний у растений, зараженных микоплазмами, затрудняет своевременное принятие необходимых мер. Растения с инаппарантными инфекциями являются резервуаром патогенов, источником их распространения в окружающей среде [Morris *et al.*, 2009]. В связи с этим весьма актуальным является поиск специфичных молекулярных маркеров инфекционного процесса. Идентифицированные нами белки *Or. sativa* L., участвующие в ответных реакциях растений на адаптированные и неадаптированные клетки микоплазмы, могут быть диагностическими маркерами латентных инфекций и скрытых патологических процессов, индуцированных микоплазмой, а также мишенями для определения механизмов формирования системы «паразит-хозяин».

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успешная реализация геномного проекта в отношении *A. laidlawii* PG8 определила возможность применения постгеномных технологий, связанных с протеомным профилированием микоплазмы и инвентаризацией белков, экспрессирующихся у бактерии в различных условиях среды, для исследования адаптации микоплазмы к действию биотических и абиотических стрессоров.

В результате использования протеомного подхода нами идентифицированы белки, участвующие в ответных реакциях *A. laidlawii* PG8 на действие различных стрессоров. Выявленные стресс-реактивные белки могут быть мишенями для определения механизмов формирования системы «паразит – хозяин» и способов её контроля.

Полученные в нашей работе данные свидетельствуют, что длительное пребывание микоплазмы в стрессовых условиях вызывает повышение уровня экспрессии PNPase – глобального регулятора вирулентности фитопатогенных бактерий и адаптации их к различным условиям среды [Carprousis, 2002; Clements *et al.*, 2002] и снижение экспрессии белков, участвующих в вирулентности микоплазмы. Сравнительный анализ вирулентных свойств *A. laidlawii* PG8, образующихся в различных условиях среды, представляет особенный интерес с точки зрения фундаментальных исследований и практических разработок, связанных с выяснением патогенного потенциала микоплазмы, определением механизмов формирования системы «паразит-хозяин» и способов ее контроля.

В наших исследованиях впервые установлено, что *A. laidlawii* PG8 обладает генотоксическими свойствами и показано, что адаптация *A. laidlawii* PG8 к стрессовым условиям сопровождается изменением

генотоксических свойств микоплазмы. Полученные данные определяют необходимость разработки принципиально новых подходов для оценки патогенного потенциала «вездесущей» микоплазмы, являющейся основным контаминантом клеточных культур, использующихся в том числе для производства вирусных вакцин [Борхсениус и др., 2002; Windsor, 2009a; David *et al.*, 2010].

*A. laidlawii* PG8 является возбудителем заболеваний у некоторых растений [Власов и др., 1985; Билай и др., 1988; Чернов и др., 2007; Eden-Green, Tully, 1979; Skripal, Egorov, 2006]. В результате наших исследований впервые показано, что *A. laidlawii* PG8 может проявлять фитопатогенность в отношении важной сельскохозяйственной культуры – *Or. sativa* L., и установлено, что вирулентные свойства клеток микоплазмы, образующихся в различных условиях среды, различаются. Адаптированные к НУС (СДС) клетки микоплазмы не проникают, в отличие от неадаптированных, в ткани листьев через корневую систему, но вызывают у растений изменения морфологии, ультраструктурной организации и экспрессии белков. Фитопатогенность адаптированных к НУС клеток *A. laidlawii* PG8 может обуславливаться секретируемыми метаболитами бактерии. Однако данные об исследованиях секретома у микоплазм пока отсутствуют.

В результате комплексного исследования клеток *A. laidlawii* PG8 с помощью ТЭМ и АСМ нами было обнаружено, что при длительном культивировании микоплазмы в стрессовых условиях происходит интенсивное образование в культуре бактерии УМФ – сферических, окруженных мембраной наноструктур, большинство из которых по размерам, морфологии, ультраструктурной организации и особенностям образования соответствуют мембранным везикулам, обеспечивающим у бактерий секрецию белков, межклеточные взаимодействия и патогенез [Lee *et al.*, 2009; Ellis, Kuehn, 2010].

Установленные нами различия экспрессии белков у *A. laidlawii* PG8 в оптимальных и стрессовых условиях могут быть связаны с особенностями белкового трафика микоплазмы в различных условиях среды, опосредуемого мембранными везикулами. Для анализа этого предположения потребуются субпротеомное профилирование микоплазмы в различных условиях среды, идентификация белков мембранных везикул и особенности их сортинга.

## ВЫВОДЫ

1. Условия культивирования *A. laidlawii* PG8 влияют на образование УМФ микоплазмы – сферических, окруженных мембраной наноструктур (объем 0,00052358-0,004 мкм<sup>3</sup>). При длительном пребывании *A. laidlawii* PG8 в стрессовых условиях (ДНТ, СДС) в культуре микоплазмы достоверно возрастает количество соответствующих УМФ.

2. Адаптация *A. laidlawii* PG8 к стрессовым условиям (ОС, ХШ, ДНТ, ИС, СДС) связана с изменением уровня экспрессии растворимых белков

микоплазмы, участвующих в репликации, репарации, рекомбинации, транскрипции, трансляции, энергообразовании, транспорте и метаболизме углеводов, аминокислот и нуклеотидов, а также вирулентности. Функции некоторых стресс-реактивных белков *A. laidlawii* PG8 не известны.

3. Различные виды стрессоров индуцируют у *A. laidlawii* PG8 модуляцию экспрессии как специфичных, так и общих белков. Модуляция экспрессии 4 из 121 идентифицированного стресс-реактивного белка микоплазмы (RpsA, Lon, SodA, GAPDH) происходит во всех стрессовых условиях – при ОС, ХШ, ДНТ, ИС и СДС.

4. Адаптация *A. laidlawii* PG8 к стрессовым условиям сопровождается изменением генотоксических свойств микоплазмы. Адаптированные к НУС (СДС) клетки *A. laidlawii* PG8, в отличие от неадаптированных, не оказывают ДНК-повреждающего действия на клетки тестерного штамма *E. coli* PQ37.

5. *A. laidlawii* PG8 проявляет фитопатогенность в отношении *Or. sativa* L. (рис посевной). Вирулентные свойства клеток *A. laidlawii* PG8, образующихся в РУС, различаются. Адаптированные к НУС (СДС) клетки микоплазмы не проникают, в отличие от неадаптированных клеток, в ткани листьев через корневую систему, но индуцируют у растений изменения морфологии и ультраструктурной организации.

6. Инфицирование *Or. sativa* L. клетками *A. laidlawii* PG8 индуцирует модуляцию экспрессии белков, участвующих в трансляции, фотосинтезе, энергообразовании, метаболизме, а также защитных реакциях. Функции большинства идентифицированных белков *Or. sativa* L., изменение уровня экспрессии которых индуцируется *A. laidlawii* PG8, не известны.

7. Ответные реакции растений *Or. sativa* L., связанные с модуляцией экспрессии белков, на инфицирование клетками *A. laidlawii* PG8, образующимися в РУС, различаются. Модуляция экспрессии 13 из 44 идентифицированных стресс-реактивных белков *Or. sativa* L. индуцируется как адаптированными к НУС (СДС), так и неадаптированными клетками *A. laidlawii* PG8, а 12 и 19 – адаптированными и неадаптированными клетками бактерии соответственно.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Чернов, В. М. Ответные реакции клеток *Acholeplasma laidlawii* PG8 на холодовой шок и окислительный стресс: протеомный анализ и стресс-реактивные белки микоплазмы / В.М. Чернов, О.А. Чернова, **Е.С. Медведева**, А.И. Сорвина, М.Н. Давыдова, М.А. Рогова, М.В. Серебрякова // ДАН. – 2010. – Т.432, Вып. 5. – С. 708-711.

2. Рафиков, Р.И. Трегалоза как субстрат роста клеток *Acholeplasma laidlawii* PG8 / Р.И. Рафиков, М.Н. Давыдова, **Е.С. Медведева**, О.В. Горшков, О.А. Чернова // Микробиология. – 2008. – Т. 77, N 3. – С. 380-381.

3. Chernov, V.M. Genotoxic effects of mycoplasma cells (*A. laidlawii* PG8, *M. gallisepticum* S6, *M. hominis* PG37) formed in different growth conditions / V.M. Chernov, O.A. Chernova, A.B. Margulis, A.A. Mouzykantov, N.B. Baranova, **E.S. Medvedeva**, A.I. Kolpakov, O.N. Ilinskaya // Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci. – 2009. – Vol. 6, N 1. – P. 104-107.
4. **Medvedeva, E.** Adaptation of mycoplasmas (*Acholeplasma laidlawii* PG8) to unfavorable environments: proteome profiling and nanoscopic analysis / E. Medvedeva, M. Trushin, A. Sorvina, M. Davydova, S. Borchsenius, O. Chernova, V. Chernov // 18th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. – Chianciano Terme, Italy, 2010.
5. **Medvedeva, E.S.** Cellular and molecular-genetic peculiarities of mycoplasma (*Acholeplasma laidlawii* PG8) reactivity to reactive oxygen species / E.S. Medvedeva, A.I. Sorvina, M.N. Davydova, O.A. Chernova, V.M. Chernov // Abstracts of 14<sup>th</sup> International conference «Microbial enzymes in biotechnology and medicine». – Kazan, 2009. – P. 98.
6. **Medvedeva, E.S.** The mycoplasma *Acholeplasma laidlawii* PG8 cells in the oxidative stress conditions: peculiarities of morphophysiology and expression of proteins / E.S. Medvedeva, A.I. Sorvina, M.N. Davydova // Abstracts of the 13th annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» «Biology: Expansion of Borders». – Kazan: Kazan State University, 2009 – P. 60.
7. Чернов, В.М. Молекулярные основы устойчивости микоплазм (*Acholeplasma laidlawii* PG8) к окислительному стрессу / **Е.С. Медведева**, М.Н. Давыдова, О.В. Горшков, И.А. Демина, О.А. Чернова, В.М. Чернов, В.М. Говорун // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Сб. тез. – Новосибирск: Арта, 2008. – С. 155.
8. **Медведева, Е.С.** Адаптация микоплазм к неблагоприятным условиям среды: особенности экспрессии белков в клетках *Acholeplasma laidlawii* PG8 при холодовом шоке и окислительном стрессе / Е.С. Медведева, А.И. Сорвина, М.Н. Давыдова, В.М. Чернов, О.А. Чернова // «Белки и пептиды» IV Российский симпозиум. Тез. докл. – Казань: Изд. «ФизтехПресс» КФТИ КазНЦ РАН, 2009. – С. 306.
9. **Медведева, Е.С.** Молекулярно–генетические особенности устойчивости *Acholeplasma laidlawii* PG8 к окислительному стрессу / Е.С. Медведева, М.Н. Давыдова, О.В. Горшков, В.М. Чернов, О.А. Чернова // Биология – наука XXI века: 12-я Пущинская международная школа-конференция молодых ученых. Сб. тез. – Пущино: Изд-во Пущинского научного центра, 2008. – С. 269.
10. **Медведева, Е.С.** Факторы устойчивости микоплазмы *Acholeplasma laidlawii* PG8 к перекиси водорода / Е. С. Медведева, М. Н. Давыдова, О. В. Горшков, О. А. Чернова, В.М. Чернов // Материалы IV межрегиональной конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой». – Саратов: Научная книга, 2008. – С. 28.
11. **Медведева, Е.С.** Клетки микоплазм *Acholeplasma laidlawii* PG8 в условиях окислительного стресса: особенности морфофизиологии и экспрессии

белков / Е.С. Медведева, А.И. Сорвина, М.Н. Давыдова // Материалы II Всероссийский, с международным участием, конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия 2009». – Перм. гос. ун-т. – Пермь, 2009. – С. 49-51.

12. **Медведева, Е.С.** Молекулярно–генетические особенности устойчивости *Acholeplasma laidlawii* PG8 к окислительному стрессу / Е.С. Медведева, М.Н. Давыдова, О.В. Горшков, И.А. Демина, В.М. Чернов, О.А. Чернова // «Постгеномная эра в биологии и проблемы в биотехнологии» II Международная научно-практическая конференция. Сб. тез. – Казань, 2008. – С. 78-79.

13. **Медведева Е.С.** Адаптация фитопатогенных микоплазм к стрессорам: наноскопический анализ и протеомное профилирование клеток *Acholeplasma laidlawii* PG8, образующихся в различных условиях среды / Е.С. Медведева, А.А. Музыкантов, М.В. Трушин // Российская школа молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии». Тез. докл. – Изд-во: Каз. ун-т, 2010. – С. 34.

14. **Медведева Е.С.** Фитопатогенность *Acholeplasma laidlawii* PG8: особенности ответных реакций *Oryza sativa* L. на инфицирование вегетативными формами и ультрамикрoформами микоплазмы / Е.С. Медведева, А.А. Музыкантов // Российская школа молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии». Тез. докл. – Изд-во: Каз. ун-т, 2010. – С. 35.

15. Сорвина, А.И. Молекулярные основы устойчивости микоплазм (*Acholeplasma laidlawii* PG8) к окислительному стрессу / А.И. Сорвина, **Е.С. Медведева** // «Симбиоз Россия 2008». «Биология: традиции и инновации в 21 веке»: Материалы I Всероссийского, с международным участием, биологическом конгрессе студентов и аспирантов-биологов. – Казань, 2008. – С. 100-102.

16. Сорвина, А.И. Ответные реакции микоплазм (*Acholeplasma laidlawii* PG8) на окислительный стресс: особенности морфофизиологии и экспрессии белков / А.И. Сорвина, **Е.С. Медведева**, М.Н. Давыдова, О.А. Чернова // Биология – наука XXI века: 13-я Пушкинская международная школа-конференция молодых ученых. Сб. тез. – Пушкино: Изд-во Пушкинского научного центра, 2009. – С. 211.

17. Сорвина, А.И. Особенности реактивности *Acholeplasma laidlawii* PG8 в отношении перекиси водорода / А.И. Сорвина, **Е.С. Медведева** // Сборник тезисов I городской студенческой конференции «Междисциплинарные исследования в области естественных наук». – Казань, 2008. – С. 30.

18. Сорвина А.И. Молекулярно-генетические основы метаболизации перекиси водорода в клетках микоплазмы *Acholeplasma laidlawii* PG8 / А.И. Сорвина, **Е.С. Медведева** // Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского государственного университета 2008 года. Сб. тез. – Казань: Изд. Каз. гос. ун-т, 2008. – С. 17-18.

### Список сокращений и условных обозначений

2D	–	двумерный (two- <b>d</b> imensional)
3D	–	трехмерный (three- <b>d</b> imensional)
АСМ	–	атомно-силовая микроскопия
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНТ	–	длительное воздействие низкой температуры
ИС	–	изменение субстрата
КОЕ	–	колониеобразующие единицы
мкм	–	микрометр
мМ	–	миллимоль
нм	–	нанометр
НУС	–	неблагоприятные условия среды
ОС	–	окислительный стресс
ППСЭ	–	полноценная питательная среда Эдварда
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РУС	–	различные условия среды
СДС	–	совокупность действия стрессоров
ТЭМ	–	трансмиссивная электронная микроскопия
УМФ	–	ультрамикроформы
ХШ	–	холодовой шок
COG	–	<b>cl</b> usters of <b>o</b> rthologous <b>g</b> roups of proteins
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	–	перекись водорода ( <b>h</b> ydrogen <b>p</b> eroxide)
NCBI	–	<b>N</b> ational <b>C</b> enter for <b>B</b> io <b>t</b> echnological <b>I</b> nformation
PNPase	–	полирибонуклеотид-нуклеотидилтрансфераза (polyribonucleotide nucleotidyltransferase)

Отзывы на автореферат просьба отправлять по адресу 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, КФУ, Отдел аттестации научно-педагогических кадров, Диссертационный совет Д 212.081.08, ученому секретарю З.И. Абрамовой, факс: (843)238-76-01.